



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**  
10 **DE 100 54 632 A 1**

51 Int. Cl. 7:  
**C 12 M 3/06**  
C 12 M 1/12  
C 12 M 1/34

21 Aktenzeichen: 100 54 632.3  
22 Anmeldetag: 3. 11. 2000  
43 Offenlegungstag: 29. 5. 2002

DE 100 54 632 A 1

71 Anmelder:  
Giesing, Michael, Prof. Dr.med., 45659  
Recklinghausen, DE  
74 Vertreter:  
Reitstötter, Kinzebach & Partner, 81679 München

72 Erfinder:  
Giesing, Michael, Prof. Dr.med., 45659  
Recklinghausen, DE; Schütz, Andreas, Dr., 45739  
Oer-Erkenschwick, DE; Uciechowski, Peter, Dr.,  
45665 Recklinghausen, DE; Grill, Hans-Jörg, Dr.,  
45659 Recklinghausen, DE

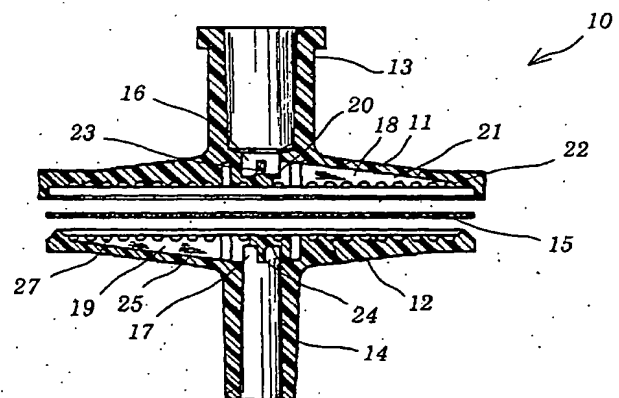
56 Entgegenhaltungen:  
DE 32 02 330 A1  
WO 00 06 702 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Verfahren zur Isolierung von disseminierten Krebszellen aus einer zellhaltigen Körperflüssigkeit und Filtervorrichtung zur Verwendung in einem derartigen Verfahren

57 Die Erfindung betrifft ein Verfahren und die Verwendung einer Vorrichtung (10) zur Isolierung von disseminierten Krebszellen aus einer zellhaltigen Körperflüssigkeit, wobei man die zellhaltige Körperflüssigkeit oder Teile davon in einen Einlaßstutzen (13) eines Filtergehäuses (11, 12) fördert, die Körperflüssigkeit seitlich aus dem Einlaßstutzen in einen einlaßseitigen Fluidraum (21) des Filtergehäuses führt und über einem in dem Filtergehäuse angeordneten Flachfilter (15) mit einer Maschen- bzw. Porenweite von etwa 10 bis 200 µm verteilt, die Körperflüssigkeit über den Flachfilter (15) transportiert und in einen auf dem Flachfilter (15) verbleibenden Rückstand und ein Filtrat auf trennt, das Filtrat in einem auslaßseitigen Fluidraum (25) sammelt und über einen Auslaßstutzen (14) abführt und anschließend den Rückstand gewinnt. Durch die spezielle strömungstechnische Verteilung der Flüssigkeit über dem Filter können disseminierte Krebszellen mit höherer Ausbeute isoliert und schonender in vitaler Form gewonnen werden. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich insbesondere zur Automatisierung der Isolierung von Krebszellen.



DE 100 54 632 A 1

## Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung von disseminierten Krebszellen aus einer zellhaltigen Körperflüssigkeit, eine Filtervorrichtung zur Verwendung in einem derartigen Verfahren, die Verwendung einer Filtervorrichtung zur Isolierung von disseminierten Krebszellen, sowie Sets zur Durchführung des Verfahrens.

[0002] Die Isolierung und Charakterisierung von Krebszellen ist vor allem im Bereich der Onkologie für die Beantwortung diagnostischer, prognostischer, therapeutischer und wissenschaftlicher Fragestellungen, sowohl im tierexperimentellen als auch im humanmedizinischen Bereich von großer Bedeutung.

[0003] Die Isolierung von Krebszellen zur Durchführung von in-vitro oder ex-vivo Untersuchungen aus Gewebeprobe, die beispielsweise von Primärtumoren oder Metastasen gewonnen werden, ist heutzutage relativ unproblematisch.

[0004] In jüngster Zeit gewinnt jedoch die Identifizierung und Charakterisierung von sogenannten disseminierten Krebszellen zunehmend an Bedeutung. Dabei handelt es sich um in Körperflüssigkeiten zirkulierende Krebszellen, die sich von Primärtumoren, Metastasen oder Rezidiven abgelöst haben. Es ist bekannt, daß disseminierte Krebszellen genetische und physiologische Merkmale aufweisen, die sich von denen des Primärtumors, der Metastase bzw. dem Rezidiv unterscheiden. Man spricht in diesem Zusammenhang von einer sogenannten "klonalen Selektion". Demnach ist der Primärtumor ein Konglomerat von Zellen mit unterschiedlicher genetische Ausstattung, die ständigen Veränderungen unterliegen. Aus diesem Konglomerat heraus disseminieren nur ganz bestimmte Zellen, nämlich diejenigen, die ein bestimmtes genetisches Profil erworben haben, das ihnen unter anderem die erforderlichen Eigenschaften zur Disseminierung verleiht und aufgrund dessen sich diese Zellen folglich von den im Zellverband verbleibenden Zellen oder von lediglich unspezifisch abgetrennten Zellen oder größeren Bruchstücken des Primärtumors unterscheiden. Die selektive Identifizierung und Charakterisierung von disseminierten Krebszellen erlaubt nicht nur speziellere und frühere Diagnosen von betroffenen Patienten, sondern ermöglicht neben der Behandlung des Primärtumors auch eine weitere und davon unabhängige, individuelle, auf disseminierte Krebszellen gerichtete Therapie.

[0005] Aufgrund der geringen Konzentration von Krebszellen in Körperflüssigkeiten sind die entsprechenden Analysen jedoch technisch extrem schwierig. Zur Isolierung der disseminierten Krebszellen müssen diese zunächst angereichert werden. Um beispielsweise Veränderungen von Krebszellen auf DNA-Ebene zu analysieren, sind extrem reine Populationen der Krebszellen erforderlich, da ansonsten verunreinigende "Wildtyp-Zellen" potentielle Genomveränderungen überdecken, so daß diese nicht mehr detektiert werden können. Daher sind Verfahren zur unspezifischen Anreicherung von Krebszellen, beispielsweise das in US 5,529, 903 beschriebene Leukapherese-Verfahren oder das in EP-A-0 448 837 beschriebene Filtrationsverfahren zur Untersuchung von disseminierten Krebszellen nicht geeignet. Bekannte spezifische Anreicherungsverfahren beruhen meist auf einer antigenspezifischen Immunadsorption. Diese Verfahren haben jedoch den Nachteil, daß durch eine Quervernetzung der Oberflächenantigene unkalkulierbare Effekte, wie Apoptose, Anergie, Aktivierung und weitere Zustandsänderungen der Zelle auftreten können, so daß sich die Eigenschaften derartiger isolierten Zellen drastisch von den Eigenschaften der in der Körperflüssigkeit disseminierten Krebszellen vor ihrer Isolierung unterscheidet. Außer-

dem kann die Sensitivität derartiger Verfahren in Fällen von fehlender oder unzureichender Epitopexpression sehr gering sein.

[0006] In der WO 00/06702 wird ein Verfahren zur Isolierung disseminierter Krebszellen aus Körperflüssigkeiten beschrieben. Mit diesem Verfahren ist es möglich, die Krebszellen auf schonende Art und Weise, insbesondere in vitalem Zustand, anzureichern, ohne daß Antikörper verwendet oder ähnliche adsorptive Wechselwirkungen eingesetzt werden müssen. Dies eröffnet nicht nur die Möglichkeit, genomische DNA-Analytik und sogar die ein Verhältnis von wenigstens 1:1 Krebszellen zu Nichtkrebszellen erfordernde LOH-Analytik (LOH = loss of heterocycosity) sinnvoll durchzuführen, sondern es werden auch disseminierte Krebszellen für eine Reihe weiterer diagnostischer, therapeutischer, tierexperimenteller oder wissenschaftlicher Fragestellungen zur Verfügung gestellt. So werden zahlreiche Verwendungsmöglichkeiten disseminierter Krebszellen beschrieben, z. B. die Identifizierung neuer therapeutischer Targets; im Rahmen der Wirkstoffentwicklung das Screenen von Wirkstoffen, z. B. die Identifizierung und Charakterisierung von Leitsubstanzen und insbesondere zur Entwicklung von Wirkstoffen gegen Oberflächenstrukturen disseminierter Krebszellen; die Wahl einer vom jeweiligen Individuum und vom Stadium der Erkrankung abhängenden Therapie. Bei dem bekannten Verfahren wird eine zellhaltige Körperflüssigkeit oder Teile davon, beispielsweise eine unspezifisch angereicherte Fraktion, durch ein Sieb mit einer Maschen- bzw. Porenweite von etwa 10 bis 200 µm geführt und der auf dem Sieb zurückbleibende Siebrückstand gewonnen. Durch Verwendung von Sieben bestimmter Maschen- bzw. Porengröße, die einen größen- und gestaltabhängigen Trennvorgang ermöglichen, wird im Siebrückstand ein Krebszellanteil von wenigstens 50% erreicht. Als Siebe werden bei den bekannten Verfahren flächige oder poröse Gebilde mit Öffnungen verwendet, die so dimensioniert sind, daß in der zellhaltigen Körperflüssigkeit enthaltene Nichtkrebszellen noch passieren können, während Krebszellen bzw. Krebszellaggregate zurück gehalten werden.

[0007] Bei den bekannten Verfahren kann es jedoch zu einer ungleichmäßigen Ansammlung von Zellen durch eine ungleichmäßige Benetzung der Sieboberfläche kommen. Der Durchfluß durch das Sieb kann daher nur schwer geregelt und kontrolliert werden. Zur Gewinnung von vitalen Zellen müssen die auf der Sieboberfläche haftenden Rückstände erst aufwendig gelöst werden. Ohne die Anwendung von hohem Druck lösen sich die Zellen bei dem bekannten Verfahren erst nach mehrstündiger oder mehrtägiger Inkubation in einem geeigneten Puffermedium von der Siebmembran. Falls man Zellbestandteile der im Siebrückstand vorhandenen Zellen gewinnen will und daher eine Zerstörung der Zellen in Kauf nehmen kann, ist es auch möglich, das Sieb samt anhaftender Zellen in ein geeignetes organisches Lösungsmittel zu überführen. Zur Isolierung von Gesamt-RNA, DNA und Proteinen verwendet man üblicherweise Guanidinisothiocyanat und Phenol enthaltende Lösungen bzw. Lösungsgemische, z. B. die unter der Marke Trizol® vertriebenen Produkte. Eine Automatisierung des bekannten Verfahrens ist allerdings nur mit einer aufwendigen Robotik möglich.

[0008] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, das aus WO 00/06702 bekannte Verfahren derart weiterzubilden, daß eine einfache Automatisierung und Standardisierung des Verfahrens ermöglicht und gleichzeitig die Reinheit der filtrierten Krebszellenfraktion weiter erhöht wird. Außerdem soll eine geeignete Filtervorrichtung zur Verwendung in einem derartigen Verfahren bereitgestellt werden.

[0009] Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß man die in einer Körperflüssigkeit disseminierten Krebszellen in wesentlich höherer Reinheit und mit besserer Ausbeute gewinnen kann, wenn man einen Flachfilter mit einer Maschen- bzw. Porenweite von etwa 10–200 µm verwendet, der in einem Filtergehäuse angeordnet ist, welches durch eine geeignete strömungstechnische Auslegung ein gleichmäßiges Durchspülen der Filterfläche ermöglicht.

[0010] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher zum einen ein Verfahren zur Isolierung von disseminierten Krebs- bzw. Tumorzellen aus einer zellhaltigen Körperflüssigkeit, wobei man die zellhaltige Körperflüssigkeit oder Teile davon in einen Einlaßstutzen eines Filtergehäuses befördert, die Körperflüssigkeit seitlich aus dem Einlaßstutzen in einen einlaßseitigen Fluidraum des Filtergehäuses führt und über einem in den Filtergehäuse angeordneten Flachfilter mit einer Maschen- bzw. Porenweite von etwa 10–200 µm im wesentlichen parallel zur Oberfläche des Flachfilters verteilt, die Körperflüssigkeit oder die Teile davon über den Flachfilter transportiert und in einem auf dem Flachfilter verbleibenden Rückstand und ein Filtrat auf trennt, das Filtrat in einem auslaßseitigen Fluidraum sammelt und über einen Auslaßstutzen abführt und anschließend den Rückstand gewinnt.

[0011] Erfindungsgemäß wird die zellhaltige Körperflüssigkeit dabei im wesentlichen senkrecht in Richtung Filteroberfläche geführt und kurz vor Erreichen der Filteroberfläche durch geeignete Umlenkmittel im wesentlichen seitlich, beispielsweise in einem Winkel von 90°, in den einlaßseitigen Fluidraum abgelenkt, so daß sich die Körperflüssigkeit praktisch über die gesamte Filterfläche verteilen kann, bevor der Flachfilter durchströmt wird. Die wirksame Filterfläche ist dabei wesentlich größer als der Innenquerschnitt des Einlaßstutzens, der die Körperflüssigkeit zu dem Filter führt. Durch die speziellen Strömungsführung tritt beim Filtrieren eine parallel zur Filteroberfläche gerichtete Strömungskomponente auf, die wirksam verhindert, daß in bestimmten Bereichen des Filters eine ungleichmäßige Ansammlung oder Verklumpung von Zellen auftritt. Dabei weist der einlaßseitige Fluidraum vorteilhaft nur eine geringe Höhe über dem Filter und damit ein geringes Volumen auf, so daß bereits eine geringe Flüssigkeitsmenge diesen Fluidraum ausfüllt.

[0012] Unter Isolierung versteht man im Sinne der vorliegenden Erfindung jegliche Anreicherung eines zu isolierenden Bestandteils aus einem Gemisch, das diesen neben wenigstens einem anderen Bestandteil enthält. Das Ergebnis der Isolierung kann also durchaus ein weiteres Gemisch sein, das aber im Vergleich zum ursprünglichen Gemisch den zu isolierenden Bestandteil im Verhältnis zu wenigstens einem anderen Bestandteil in höherer Konzentration enthält.

[0013] Der Begriff "Krebszelle" steht erfindungsgemäß für eine Zelle, die eine oder mehrere mit Krebs, also Entartung im allgemeinen Sinn, in Zusammenhang stehende Modifikation aufweist. Grundlage dieser Definition ist die Vorstellung, daß es sich bei der Entstehung von Krebs um einen kontinuierlichen Veränderungsprozeß handelt. Beispielsweise bedarf es in der Regel mehrerer Veränderungen, insbesondere des genetischen Materials bzw. der Expression des genetischen Materials von Zellen auf dem Weg von einer Normalzelle zu einer Krebs- und insbesondere zu einer Tumorzelle. Der Begriff Krebszelle umfaßt daher auch Vorstufen von Krebs- und insbesondere Tumorzellen mit krebsartigen bzw. tumorösen Modifikationen.

[0014] Die Begriffe "disseminierte Krebszelle" oder "disseminierte Tumorzelle" definieren sich insbesondere im Verhältnis zu soliden Tumoren, also vor allem Primärtumoren, Metastasen und Rezidiven. Im Gegensatz zu soliden Tumoren können disseminierte Krebszellen im Körper eines

Individuums zirkulieren. Dies geschieht in der Regel über körpereigene Transportorgane, vor allem Körperflüssigkeiten, insbesondere Blut. In der Regel leiten sich disseminierte Krebszellen von einem soliden Tumor dadurch ab, daß sie zunächst Teil eines soliden Tumors, also insbesondere des Tumorgewebes, sind, von dem sie sich in Folge ablösen. Dadurch verlassen disseminierte Krebszellen den durch den soliden Tumor vorgegebenen Körperbereich, insbesondere die vom Tumor befallenen morphologischen Struktureinheiten, beispielsweise das Organ, und gelangen unter anderem an Orte, zu denen ausgehend vom soliden Tumor kein morphologischer Zusammenhang besteht.

[0015] Einem besonderen Aspekt zufolge sind disseminierte Krebszellen gekennzeichnet durch ihre relativ geringe Menge bezogen auf gleichermaßen vorhandene Nichtkrebszellen. Man bezeichnet sie daher auch als Restkrebszellen (minimal residual disease, kurz MRD). Betrachtet man beispielsweise zellhaltige Körperflüssigkeiten, so liegt der Anteil disseminierter Krebszellen in der Regel unterhalb von 1 : 1000, meist unterhalb von 1 : 10.000 und in vielen Fällen sogar unterhalb von 1 : 100.000, bezogen auf die Anzahl von Nichtkrebszellen einer zufällig genommenen Probe der Körperflüssigkeit. Im Falle von Blut gelten diese Verhältnisse insbesondere in bezug auf mononukleäre Zellen (kurz:

MNC).

[0016] Zellhaltige Körperflüssigkeiten im Sinne der vorliegenden Erfindung sind all jene Körperflüssigkeiten, welchen disseminierte Krebszellen enthalten können. Dabei kann es sich sowohl um native Körperflüssigkeiten handeln, die dem Körper entnommen werden oder von diesem ausgeschieden werden, als auch um nichtnative Flüssigkeiten, insbesondere Waschflüssigkeiten, die Zellen aus dem Körper und insbesondere bestimmten Körperteilen und Organen enthalten. Man kann beispielsweise derartige Flüssigkeiten dem Körper zunächst in geeigneter Weise zuführen und dann wieder entnehmen. Selbstverständlich können auch native mit nichtnativen Flüssigkeiten versetzt sein. Zu nennen sind beispielsweise Lymphe, Urin, Sputum, Ascites, Ergüsse, Fruchtwasser, Punkate, Waschflüssigkeiten von Organen, z. B. Colon-, Lungen-, Bronchiallavage oder Blasen-spülflüssigkeiten, Aphereseprodukte, Fäzes und insbesondere Knochenmark (vor oder nach Transplantation) und Blut. Es kann sich um Körperflüssigkeiten unterschiedlicher Spezies handeln, beispielsweise von Säugern, insbesondere Menschen, Labor- und Versuchstieren, wie Mäusen, Ratten, Kaninchen, Meerschweinchen usw. Derartige Körperflüssigkeiten können dem Siebvorgang direkt zugeführt werden. Vielfach ist es allerdings von Vorteil, die zellhaltige Körperflüssigkeit zunächst einer vorbereitenden Aufbereitung zu unterziehen. So kann man beispielsweise zelluläre von nichtzellulären Bestandteilen trennen. Auch die zellulären Bestandteile können ggf. noch weiter aufgetrennt werden, indem man beispielsweise eine zellhaltige Fraktion isoliert, in der bekanntermaßen Krebszellen mit enthalten sind. Zu diesem Zweck bieten sich vor allem an sich bekannte physikalische Trennverfahren, wie die Dichtegradientenzentrifugation, an.

[0017] Bevorzugt ist der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendete Flachfilter im wesentlichen kreisförmig zugeschnitten. Das zu filtrierende Fluid, also die Körperflüssigkeit oder Teile davon, kann beispielsweise durch im einlaßseitigen Fluidraum angeordnete, radial vom Ende des Einlaßstutzens zum Außenrand des Flachfilters verlaufende Kanäle über die Filterfläche verteilt werden. Es ist auch denkbar, einen spiralförmig vom Einlaßstutzen zum Außenrand des Flachfilters verlaufenden Kanal vorzusehen. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens verteilt man das zellhaltige Fluid

aber über radial angeordnete Stichkanäle und eine Vielzahl konzentrischer, mit den Stichkanälen kommunizierender Kreiskanäle über den Flachfilter.

[0018] Zur Realisierung der als besonders vorteilhaft erkannten Strömungsführung der zu filtrierenden zellhaltigen Körperflüssigkeit eignen sich insbesondere Filtervorrichtungen, wie sie beispielsweise in den US-Patenten US 2,818,178 und US 4,113,627 oder der deutschen Patentanmeldung DE-A-28 09 321 beschrieben sind. Besonders bevorzugt wird jedoch das in der deutschen Patentanmeldung DE-A-32 02 330 beschriebene Filtergehäuse verwendet. Derartige Filtervorrichtungen werden heute beispielsweise von der Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland unter der Marke MINISART®, von der Millipore Corp. unter den Produktbezeichnungen MILLEX und MULTILEX oder von der Firma Advantec MFS, Inc. als Einmalfilter zur Hochreinigung von Flüssigkeiten bzw. zur Steril- oder Klärfiltration vertrieben. Die dabei verwendeten Porendurchmesser der Filtermembranen liegen jedoch typischerweise im Bereich von einem Mikrometer und weniger. Die besondere Eignung derartiger Filtergehäuse in Verbindung mit Flachfiltern einer Porengröße im Bereich von 10 bis 200 µm zur Isolierung von disseminierten Krebszellen war daher völlig überraschend.

[0019] Werden Krebszellen aus Blut isoliert, so ist erfindungsgemäß bevorzugt, zunächst Zellen des weißen Blutbildes durch Dichtegradientenzentrifugation abzutrennen. Krebszellen findet man vor allem in der Fraktion, die auch mononukleäre Zellen enthält, so daß diese Fraktion bevorzugt der anschließenden Filtration zugeführt wird.

[0020] Die Filtration der zellhaltigen Körperflüssigkeit oder der Fraktion ist beendet, wenn die gesamte zellhaltige Flüssigkeit den Flachfilter passiert hat. Es kann sich ein Waschvorgang anschließen, bei dem weitere Flüssigkeit, vorzugsweise Puffer oder Kulturmedium, durch den Flachfilter geführt wird. Die Waschflüssigkeit kann zu dem zuvor gewonnenen Filtrat gegeben oder auch getrennt davon gesammelt und ggf. verworfen werden.

[0021] Die auf dem Flachfilter zurückgehaltene Zellfraktion kann direkt der sich anschließenden Verwendung, beispielsweise der Charakterisierung der Zellen, insbesondere der Krebs- oder Tumorzellen oder der Aufbewahrung zugeführt werden. Vorteilhafterweise wird der die Krebszellen enthaltende Rückstand zunächst von dem Flachfilter abgelöst und gesammelt. Je nach Art der anschließenden Verwendung kann man zu diesem Zweck verschiedene Vorgehensweisen wählen.

[0022] Man beispielsweise den Rückstand in einer Lösung inkubieren, die zur Lyse der Zellen führt und die Gewinnung von Zellbestandteilen, wie Nukleinsäuren, Proteinen oder Lipiden erlaubt. Zur Gewinnung von Nukleinsäuren wird man beispielsweise eine Guanidinisothiocyanat und Phenol enthaltenden Lösung verwenden. Dabei ist es vorteilhaft, wenn die Lösung während der Inkubation bewegt wird. Bei einer manuellen Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann man beispielsweise jeweils einen Spritzenkolben am Einlaß- und am Auslaßstutzen der Filtervorrichtung anschließen und die Lösung zwischen den beiden Spritzen hin und her pumpen. Bei einem automatisierten Verfahrensablauf kann eine entsprechende Bewegung der Lösung durch Fördermittel, wie beispielsweise Pumpen realisiert werden.

[0023] Zur Gewinnung vitaler Krebszellen löst man den am Flachfilter anhaftenden Rückstand vorteilhaft durch Rückspülen des Filters mit einer Flüssigkeit ab, die man vom auslaßseitigen Fluidraum des Filtergehäuses in den einlaßseitigen Fluidraum fördert. Vorteilhaft handelt es sich bei der Rückspülflüssigkeit um eine Pufferlösung oder ein Kul-

turmedium. Die so gewonnen Krebs- oder Tumorzellen können beispielsweise zur Gewinnung von Zellbestandteilen oder von Vakzinen kultiviert werden.

[0024] Die beiden beschriebenen Verfahren besitzen den Vorteil, daß sie in einem automatisierten Verfahren ohne aufwendige Robotik realisiert werden können, während andere Verfahren, beispielsweise solche, bei denen die Krebszellen mit Zentrifugalkraft oder mittels sogenannter optischer Pinzetten von der Filteroberfläche abgelöst werden umfangreichere, Manipulationen erfordern und daher einer Automatisierung nur schwer zugänglich sind.

[0025] Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren gewonnenen Krebs- bzw. Tumorzellen lassen sich im Bereich des Drug-Screening bzw. Drug-Targeting zur Identifizierung neuer Wirkstoffe oder zur Identifizierung weiterer Zielgruppen für bereits bekannte Wirkstoffe verwenden. Weitere Anwendungen liegen im Bereich Genomics und Proteomics. Zur detaillierten Darstellung der erfindungsgemäß vorgesehenen Anwendungen, sowie typischer Protokolle bei der Gewinnung und Aufbereitung der filtrierten Krebszellen sei auf die WO 00/06702 des Anmelders verwiesen.

[0026] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung einer Filtervorrichtung, die ein Filtergehäuse mit wenigstens einem Einlaßstutzen und wenigstens einem Auslaßstutzen und einen in dem Filtergehäuse angeordneten Flachfilter umfaßt, welcher einen einlaßseitigen Fluidraum von einem auslaßseitigen Fluidraum trennt, wobei das Filtergehäuse zumindest in dem einlaßseitigen Fluidraum erste Verteilerkanäle aufweist, die zu dem Flachfilter hin offen sind, zur Isolierung von disseminierten Krebszellen aus einer zellhaltigen Körperflüssigkeit.

[0027] Die Verteilerkanäle umfassen, wie oben bereits erwähnt, besonders bevorzugt eine Vielzahl konzentrischer Kreiskanäle, welche durch mehrere radial verlaufende und in dem Einlaßstutzen endende Stichkanäle geschnitten sind, was eine besonders effektive Verteilung der zu filtrierenden Flüssigkeit über der Filteroberfläche gewährleistet. Vorzugsweise ist ein derartiges Verteilersystem nicht nur im einlaßseitigen Fluidraum sondern auch in den auslaßseitigen Fluidraum vorgesehen. Diese zweiten Verteilerkanäle umfassen zweite Kreiskanäle und zweite Stichkanäle, die weitgehend mit den ersten Kreiskanälen und den ersten Stichkanälen übereinstimmen, wobei jedoch die zweiten Stichkanäle in den Auslaßstutzen des Filtergehäuses münden.

[0028] Um das über den Einlaßstutzen einströmende Fluid möglichst effektiv über eine größere Filterfläche zu verteilen, endet der Einlaßstutzen und/oder der Auslaßstutzen mit seinem inneren Querschnitt dicht oberhalb einer von der Kanalsohle der Kreiskanäle gebildeten Ebene als Sackloch oder als Prallplatte. Die Stichkanäle schneiden das Sackloch im Bereich des Sacklochbodens zur Bildung von Verbindungsschlitten teilweise an. Der Boden des Sacklochs gewährleistet dabei eine zusätzliche Abstützung des Flachfilters.

[0029] Die Kreiskanäle sind im Querschnitt bevorzugt halbkreisförmig ausgebildet. Vorteilhaft reicht der den Verbindungsschlitten der Peripherie am nächsten liegende Kreiskanal mit seiner Kanalsohle etwa bis zur äußeren Höhe der Verbindungsschlitten und verbindet als Kurzschlußbrille sämtliche Verbindungsschlitten untereinander.

[0030] Das Filtergehäuse ist bevorzugt als zweiteiliges Kunststoffgehäuse ausgebildet, wobei jedes Gehäuseteil einschließlich der zugehörigen Verteilerkanäle vorteilhaft als einstückiges Kunststoffspritzteil ausgebildet ist.

[0031] Während die an sich bekannten zur Mikrofiltration eingesetzten Einmalfilter mit Flachfiltern versehen sind, die typischerweise eine Porengröße von unter 1 µm besitzen, weist der erfindungsgemäße Flachfilter eine Maschen- bzw.

Porenweite von etwa 10–200 µm, vorzugsweise von 15 bis 30 µm, besonders bevorzugt von 17–27 µm und ganz besonders bevorzugt von etwa 20 µm auf. Vorteilhaft ist der Flachfilter als Membranfilter ausgebildet, wobei typische Filtermaterialien, wie Kunststoffnetzwerke oder Gewebe, mikroporöse Membranfilter, Filterfliese oder Kombinationen davon eingesetzt werden können. Geeignete Filtermaterialien und geeignete Herstellungsverfahren für derartige Filter sind insbesondere in der WO 00/06702 beschreiben. Besonders bevorzugt werden Filter aus lösungsmittelbeständigem Material verwendet, die beispielsweise aus Kunststoffen, wie Polypropylen, Polytetrafluorethylen, hochfluoriertem Polymeren, Vinylidenfluorid, Aminoplasten, insbesondere Polyethylen bestehen können. Zur Auswahl des für die Isolierung bestimmter Krebszellen jeweils geeigneten Filters wird der Fachmann in Vorversuchen mit immer engermaschigen Filtern (beispielsweise in der Reihenfolge 200 µm, 115 µm, 74 µm, 51 µm, 38 µm, 30 µm, 27 µm, 20 µm, 17 µm, 15 µm und 10 µm) einzelne Zellfraktionen gewinnen und auf deren therapeutische und diagnostische Relevanz untersuchen. Dabei kann es sich auch als vorteilhaft erweisen Filterkombinationen einzusetzen, d. h. in obigem Beispiel etwa mit einem 115 µm-Filter weniger relevante größere Aggregate abzufiltrieren und lediglich die auf einem nachgeschalteten 30 µm-Filter gesammelte Krebszellenfraktion zu analysieren.

[0032] Die Verbindung und Abdichtung des Flachfilters mit den beiden Gehäuseteilen bzw. auch die Verbindung der beiden Gehäuseteile untereinander erfolgt durch übliche Verbindungstechniken, wie Kleben, Verschweißen, Ultraschallverschweißen oder einfach durch Klemm- und Reibungskopplung oder mit Hilfe von Einrastungen einzelner Bauteile bzw. durch Kombination derartiger Verbindungsmittel.

[0033] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch eine Filtervorrichtung zur Isolierung von disseminierten Krebszellen aus einer zellhaltigen Körperflüssigkeit, die ein Filtergehäuse mit wenigstens einem Einlaßstutzen und wenigstens einem Auslaßstutzen und einen in dem Filtergehäuse angeordnete Flachfilter umfaßt, wobei der Flachfilter einen einlaßseitigen Fluidraum von einem auslaßseitigen Fluidraum trennt und das Filtergehäuse zumindest in dem einlaßseitigen Fluidraum erste Verteilerkanäle aufweist, die zu dem Flachfilter hin offen sind. Diese an sich bekannte Filtervorrichtung ist erfindungsgemäß dadurch gekennzeichnet, daß der Flachfilter eine Maschen- bzw. Porenweite von etwa 10–200 µm, vorzugsweise von 15 bis 30 µm, besonders bevorzugt von 17–27 µm und ganz besonders bevorzugt von etwa 20 µm aufweist. Besonders bevorzugt besteht der Flachfilter aus einer mikroporforierten Nylonmembran.

[0034] Die Filterkanäle der erfindungsgemäßen Filtervorrichtung umfassen vorteilhaft eine Vielzahl konzentrischer Kreiskanäle, welche durch mehrere radial verlaufende und in dem Einlaßstutzen endende Stichkanäle geschnitten sind.

[0035] Die erfindungsgemäße Filtervorrichtung ermöglicht nicht nur eine effektive und gleichmäßige Verteilung der zu filtrierenden Flüssigkeit auf der Filteroberfläche, sondern die Anordnung aus zahlreichen konzentrischen Kreiskanälen gewährleistet auch eine wirksame Abstützung des Flachfilters über der gesamten wirksamen Filterfläche, so daß es im Betrieb zu keiner Beschädigung des Filters kommen kann.

[0036] Beim Rückspülen des Filters zum Ablösen der zurückgehaltenen Krebszellen unterstützt das durch den erfindungsgemäßen Filter gewährleistete Strömungsprofil höhere Scherkräfte parallel zur Filteroberfläche, die das Ablösen der Krebszellen begünstigen.

[0037] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch eine Einmalkartusche, welche wenigstens die erfindungsgemäße Filtervorrichtung und einen an den Einlaßstutzen der Filtervorrichtung angeschlossenen Probebehälter umfaßt.

5 Gegebenenfalls kann auch ein Auffangbehälter für die gewonnenen Krebszellen bzw. für die Lyseprodukte dieser Krebszellen Teil der Einmalkartusche sein. Die Einmalkartusche kann nach Abschluß des Filtrationsvorgang problemlos gegen eine neue Kartusche ausgetauscht werden.

10 [0038] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist schließlich auch ein Set aus einer Filtervorrichtung oder einer solchen Einmalkartusche und weiteren Mitteln zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

[0039] Die vorliegende Erfindung wird im folgenden unter Bezugnahme auf in den beigefügten Zeichnungen dargestellte Ausführungsbeispiele ausführlicher beschrieben.

15 [0040] In den Zeichnungen zeigt:

[0041] Fig. 1 einen Schnitt durch eine erfindungsgemäße Filtervorrichtung zur Isolierung von disseminierten Krebs-

20 zellen;

[0042] Fig. 2 eine Aufsicht auf die Verteilerkanäle der Filtervorrichtung der Fig. 1;

[0043] Fig. 3 eine schematische Darstellung eines automatisierten erfindungsgemäßen Verfahrens zur Isolierung

25 von disseminierten Krebszellen.

[0044] In den Fig. 1 und 2 ist eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Filtervorrichtung zur Isolierung von disseminierten Krebszellen dargestellt. Das Gehäuse der Filtervorrichtung mit den strömungstechnischen Einrichtungen entspricht dem in der deutschen Patentanmeldung DE-A-32 02 330 (Sartorius) dargestellten und dort ausführlicher beschriebenen Filtergehäuse. Kurz zusammengefaßt weist die Filtervorrichtung 10 zwei im wesentlichen symmetrisch aufgebaute Gehäuseteile 11 und 12 auf, die mit einem Einlaßstutzen 13 bzw. einem Auslaßstutzen 14 versehen sind. Im dargestellten Beispiel ist der Einlaßstutzen 14 ein Luer-Konus ist. An die Stutzen 13, 14 können Spritzen oder in der Modizintechnik übliche Schlauchsysteme angeschlossen werden. Zwischen den beiden Gehäuseteilen 11, 12 ist ein im wesentlichen flächig ausgebildeter Membranfilter 15 angeordnet. Der Einlaßstutzen 13 auf, der Auslaßstutzen 14 endet mit seinem inneren Querschnitt dicht oberhalb des Membranfilters 15 als Sackloch 16 bzw. 17. Im Bereich des Sacklochbodens münden radiale Stichkanäle 18 bzw. 19 in den Stutzen 13 bzw. 14. Die über den Einlaßstutzen 13 einströmende zu filtrierende Körperflüssigkeit wird über Verbindungsschlitz 20 zwischen den Stichkanälen 18 und dem Sackloch 16 seitlich in den von dem oberen Gehäuseteil 11 und der Membran 15 definierten einlaßseitigen Fluidraum 21 geführt und über mit den Stichkanälen 18 kommunizierende Kreiskanäle 22 über die gesamte Fläche der Filtermembran 15 verteilt (vgl. insbesondere die Unteransicht des Gehäuseteils 11 in Fig. 2). Der Boden des Sacklochs 16 weist einen den Fluidstrom in die Verbindungsschlitz 20 ablenkenden kegeligen Strömungsteiler 23 auf, welcher die Strömungsführung der einfließenden Flüssigkeit begünstigt und Stauzonen im Bereich des Sacklochs 16 vermeidet. Ein entsprechender Strömungsteiler 24 ist auch im Sackloch 17 des Auslaßstutzens 14 vorgesehen, was einen wirksamen Abtransport des Filtrats aus dem auslaßseitigen Fluidraum 25 ermöglicht. Im dargestellten Beispiel ist der innerste Kreiskanal 26 als Kurzschlußkanal ausgebildet, der sämtliche Stichkanäle 18 unmittelbar hinter den Verbindungsschlitz 20 kurz schließt, was wiederum eine gleichmäßige Strömungsverteilung über die gesamte Fläche des Membranfilters 15 gewährleistet (vergl. insbesondere Fig. 2).

[0045] Die Verwendung der erfindungsgemäßen Filtervorrichtung ermöglicht auch eine besonders einfache Automatisierung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Isolierung von disseminierten Krebszellen aus einer zellhaltigen Körperflüssigkeit.

[0046] In Fig. 3 ist eine Ausführungsform einer Vorrichtung 40 zur automatisierten Isolierung von Krebszellen schematisch dargestellt. Kernstück der Vorrichtung 40 ist eine Einmal-Kartusche 30, die einen Probenbehälter 31, die erfindungsgemäße Filtervorrichtung 10 und einen Auffangbehälter 32 enthält. Eine Leitung 33 führt vom Probenbehälter 31 zum Einlaßstutzen 13 des Filters 10. Über ein T-Stück führt eine Leitung 34 von der Leitung 33 zum Auffangbehälter 32. Vom Auslaßstutzen 14 des Filters 10 führt eine Leitung 35 weg, in die, ebenfalls über ein T-Stück, eine Leitung 36 mündet. Die Einmal-Kartusche 30 wird so in die Isoliervorrichtung 40 gesetzt, daß die Leitungen 33, 34, 35 und 36 durch steuerbare Schlauchklemmen 41, 42, 43 und 44 laufen. Die Vorrichtung 40 umfaßt ein steuerbares 6-fach Ventil 45 und ein steuerbares 4-fach Ventil 46, mit deren Hilfe Wasser aus einem Behälter 47, Pufferlösung aus einem Behälter 48 und ein organisches Lösungsmittel, wie Trizol®, aus einem Behälter 49 entweder über den Einlaßstutzen 13 oder den Auslaßstutzen 14 durch die Filtervorrichtung 10 geleitet werden können. Die zu isolierenden Krebszellen enthaltende Körperflüssigkeit oder Teile bzw. Fraktionen davon, beispielsweise eine Fraktion menschlichen Blutes, wird in den Probenbehälter 31 gefüllt. Durch entsprechende Schaltung des Ventils 45 und mittels nicht dargestellter Förderpumpen wird Pufferlösung aus dem Behälter 48 über die Leitungen 50 und 51 in den Behälter 31 gepumpt, so daß die Körperflüssigkeit über geöffnete Ventile 41 und 43 aus dem Behälter 31 durch den Filter 10 gefördert wird. Im dargestellten Beispiel wird das Filtrat in einem Abfallbehälter 52 gesammelt. Nach Filtrieren der gesamten Probe wird der über dem Filter 10 verbleibende Rückstand vom Filter gelöst und in dem Auffangbehälter 32 gesammelt. Dazu werden die Ventile 41 und 43 geschlossen und die Ventile 42 und 44 geöffnet. Durch entsprechende Schaltung der Ventile 45 und 46 wird nun Pufferlösung über die Leitungen 50, 53 und 36 im Gegenstrom zur ursprünglichen Förderrichtung der Körperflüssigkeit durch den Filter 10 gepumpt. Dabei lösen sich die am Filter anhaftenden Krebszellen und werden über die Leitung 34 in den Auffangbehälter 32 transportiert. Es ist auch möglich, zum Ablösen der Zellen anstelle von Pufferlösung ein flüssiges Kulturmedium zu verwenden.

[0047] Aus den im Behälter 32 gesammelten vitalen Zellen lassen sich beispielsweise Zelllinien kultivieren. Für Anwendungszwecke, bei denen die Gewinnung von vitalen Zellen nicht erforderlich ist, kann auch ein organisches Lösungsmittel oder eine Lösungsmittelgemisch, wie Trizol®, zum Ablösen der Zellen verwendet werden. In diesem Fall fördert man vorzugsweise eine bestimmte Menge Trizol® aus dem Behälter 49 über die Leitungen 54 und 36 in den Filter 10. Man kann dann die (nicht dargestellte) Förderpumpe anhalten und die auf dem Filter gesammelten Krebszellen eine gewisse Zeit in dem Lösungsmittel inkubieren, was zur Auflösung der Zellen führt. Man kann aber auch durch alternierenden Betrieb einer Förderpumpe eine Hin- und Herbewegung des Lösungsmittels in der Filtervorrichtung 10 induzieren. Bei manuellem Betrieb kann man an den Stutzen 13 und 14 (hier nicht dargestellte) Spritzenkolben anschließen und eine gewisse Menge Lösungsmittel durch den Filter 10 hin und her bewegen. Im dargestellten Beispiel werden die Zellfragmente schließlich mit weiterem Trizol® über die Leitung 34 in den Auffangbehälter gefördert. In diesem Fall kann der Auffangbehälter aber auch hinter dem

Auslaßstutzen 14 angeordnet sein, wobei man dann Trizol® über die Leitungen 53 und 51 und den Probenbehälter 31 über die Einlaßseite in den Filter 10 fördert. Über Leitungen 55 und 56 kann das System mit Reinigungsmitteln, Luft oder Wasser gespült werden.

[0048] Bei einer weitgehenden Automatisierung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann man auch (hier nicht dargestellte) computergesteuerte Greifarme vorsehen, welche die Kartuschen 30 nach Beendigung eines Filtrationsvorgangs gegen Reinigungskartuschen oder gegen neue Einmal-Kartuschen 30 austauschen. Die Kartuschen können über Transportbänder an die Vorrichtung 40 herangeführt werden.

#### Patentsprüche

1. Verfahren zur Isolierung von disseminierten Krebszellen aus einer zellhaltigen Körperflüssigkeit, wobei man die zellhaltige Körperflüssigkeit oder Teile davon in einen Einlaßstutzen eines Filtergehäuses fördert, die Körperflüssigkeit seitlich aus dem Einlaßstutzen in einen einlaßseitigen Fluidraum des Filtergehäuses führt und über einem in dem Filtergehäuse angeordneten Flachfilter mit einer Maschen- bzw. Porenweite von etwa 10 bis 200 µm im wesentlichen parallel zur Oberfläche des Flachfilters verteilt, die Körperflüssigkeit über den Flachfilter transportiert und in einen auf dem Flachfilter verbleibenden Rückstand und ein Filtrat aufrennt, das Filtrat in einem auslaßseitigen Fluidraum sammelt und über einen Auslaßstutzen abführt, und anschließend den Rückstand gewinnt.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die Körperflüssigkeit über radial angeordnete Stichkanäle und eine Vielzahl konzentrischer, mit den Stichkanälen kommunizierender Kreiskanäle über dem Flachfilter verteilt.
3. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man zunächst eine zellhaltige Fraktion aus der Körperflüssigkeit isoliert und anschließend filtriert.
4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man den Rückstand von dem Flachfilter ablöst und sammelt.
5. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß man den Rückstand durch Rückspülen einer Flüssigkeit von dem auslaßseitigen Fluidraum in den einlaßseitigen Fluidraum ablöst.
6. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, den Rückstand in Guanidinisothiocyanat und Phenol enthaltenden Lösungen inkubiert.
7. Verwendung einer Filtervorrichtung, die ein Filtergehäuse (11, 12) mit wenigstens einem Einlaßstutzen (13) und wenigstens einem Auslaßstutzen (14) und einen in dem Filtergehäuse (11, 12) angeordneten Flachfilter (15) umfaßt, welcher einen einlaßseitigen Fluidraum (21) von einem auslaßseitigen Fluidraum (25) trennt, wobei das Filtergehäuse (11, 12) zumindest in dem einlaßseitigen Fluidraum (21) erste Verteilerkanäle (18, 22) aufweist, die zu dem Flachfilter (15) hin offen sind, zur Isolierung von disseminierten Krebszellen aus einer zellhaltigen Körperflüssigkeit.
8. Verwendung gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Verteilerkanäle (18, 22) eine Vielzahl konzentrischer Kreiskanäle (22) umfassen, welche durch mehrere radial verlaufende und in dem Einlaßstutzen (13) endende Stichkanäle (18) geschnitten sind.

9. Verwendung gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß zweite Verteilerkanäle, welche zweite Kreiskanäle (27) und zweite Stichkanäle (19) umfassen, in dem auslaßseitigen Fluidraum (25) vorgesehen sind, wobei die zweiten Stichkanäle (19) in dem Auslaßstutzen (14) enden. 5

10. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Einlaßstutzen (13) und/oder der Auslaßstutzen (14) mit seinem inneren Querschnitt dicht oberhalb einer von den Kanalsohlen der Kreiskanäle (22) gebildeten Ebene als Sackloch (16 bzw. 17) endet. 10

11. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Filtergehäuse (11, 12) als zweiteiliges Kunststoffgehäuse ausgebildet ist. 15

12. Verwendung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Flachfilter (15) eine Maschen- bzw. Porenweite von etwa 10 bis 200 µm, vorzugsweise von 15 bis 30 µm, besonders bevorzugt von 17-27 µm und ganz besonders bevorzugt von etwa 20 µm aufweist. 20

13. Verwendung gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß der Flachfilter (15) ein Membranfilter ist.

14. Filtervorrichtung zur Isolierung von disseminierten Krebszellen aus einer zellhaltigen Körperflüssigkeit, die ein Filtergehäuse (11, 12) mit wenigstens einem Einlaßstutzen (13) und wenigstens einem Auslaßstutzen (14) und einen in dem Filtergehäuse (11, 12) angeordneten Flachfilter (15) umfaßt, wobei der Flachfilter einen einlaßseitigen Fluidraum (21) von einem auslaßseitigen Fluidraum (25) trennt und das Filtergehäuse (11, 12) zumindest in dem einlaßseitigen Fluidraum (21) erste Verteilerkanäle (18, 22) aufweist, die zu dem Flachfilter (15) hin offen sind, dadurch gekennzeichnet, daß der Flachfilter (15) eine Maschen- bzw. Porenweite von etwa 10 bis 200 µm aufweist. 25 30 35

15. Filtervorrichtung gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß der Flachfilter (15) eine Maschen- bzw. Porenweite von 15 bis 30 µm, besonders bevorzugt von 17-27 µm und ganz besonders bevorzugt von etwa 20 µm aufweist. 40

16. Filtervorrichtung gemäß einem der Ansprüche 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Flachfilter eine Nylonmembran ist. 45

17. Filtervorrichtung gemäß einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Verteilerkanäle (18, 22) eine Vielzahl konzentrischer Kreiskanäle (22) umfassen, welche durch mehrere radial verlaufende und in dem Einlaßstutzen (13) endende Stichkanäle (18) geschnitten sind. 50

18. Einmalkartusche umfassend wenigstens eine Filtervorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 17 und wenigstens einen an dem Einlaßstutzen der Filtervorrichtung angeschlossenen Probenbehälter. 55

19. Set aus einer Filtervorrichtung oder einer Einmalkartusche nach einem der Ansprüche 14 bis 18 und weiteren Mitteln zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 8 bis 13. 60

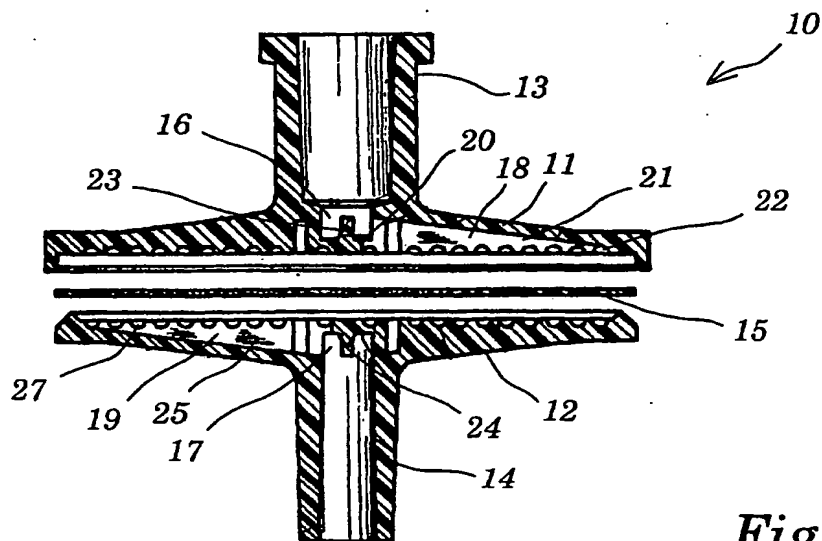
---

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

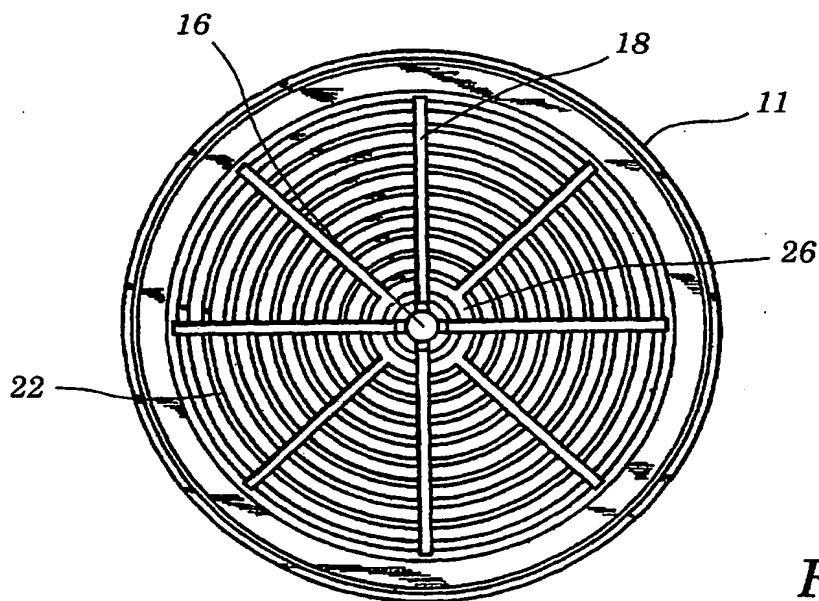
---

- Leerseite -

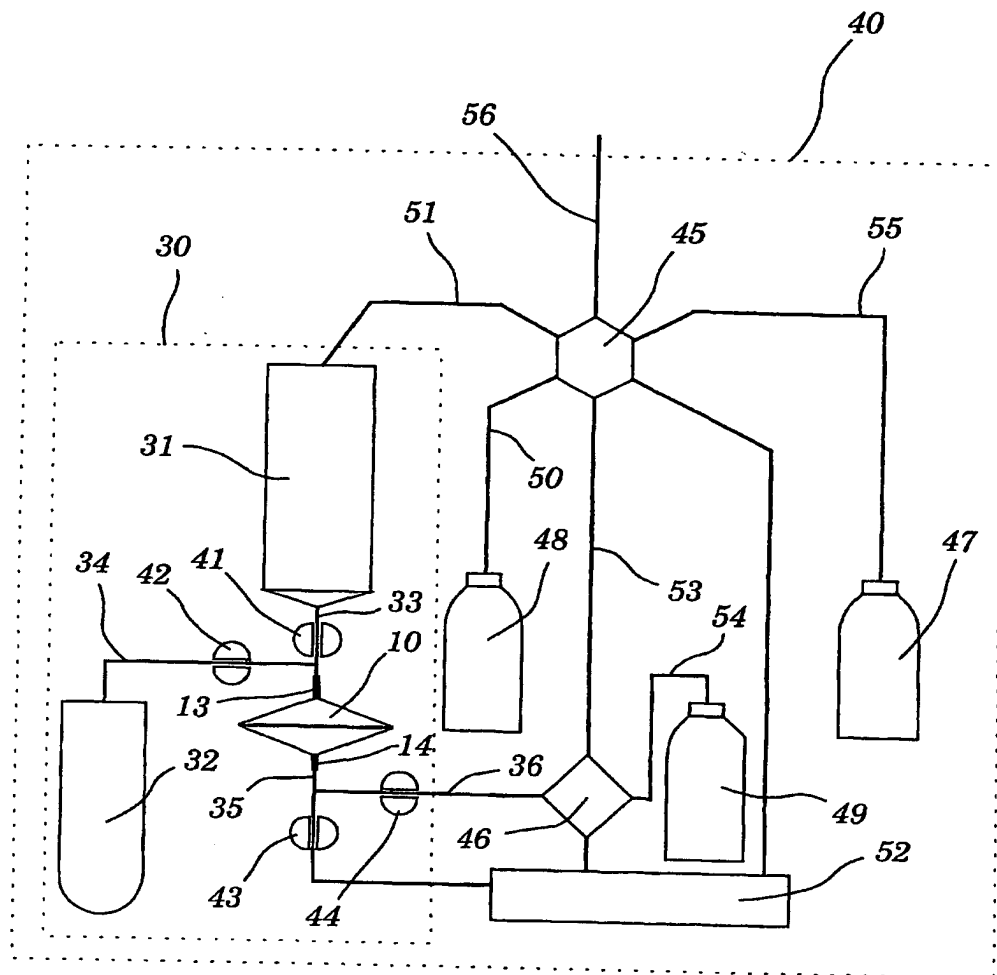




*Fig. 1*



*Fig. 2*



*Fig. 3*